

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Pangan dan Analisa Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang dimulai pada bulan April sampai Oktober 2019.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu blender, gelas ukur, timbangan analitik, botol gelap, plastik warp, kertas saring, spatula, cup plastik, baskom, sendok, pengaduk, panci *stainless steel*, timbangan analitik (*Pioneer Ohaus PA413*) ketelitian 0,01 g, gelas ukur, mixer (*Philips*), *Freezer*, *tupperware*, kompor, wajan, labu ukur, tube, *centrifuse* (*Gemmy PLC-03*), tabung reaksi, rak penyangga, vortex, tisu, plastik klip, aluminium foil, spektrofotometer *UV Vis* (*Thermo Spectronic Genesys 20*), kuvet, pipet ukur, *beaker glass*, oven, cawan porselin, desikator, sarung tangan, *stopwatch*, dan batang pengaduk.

##### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu bunga telang yang diperoleh dari Tidar Malang, asam sitrat, dan aquades, susu sapi segar yang diperoleh dari KUD Pujon, susu skim, gula pasir, CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), agar-agar rumput laut dan mentega putih yang diperoleh dari toko bahan kue Prima, larutan pigmen bunga telang, es batu, serbuk DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl Hidrazil), etanol 96%, larutan KCl, HCl 37%, Na-asetat, pelarut metanol asam, buffer pH 1 dan 4,5.

#### 3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental dengan desain Rancangan Tersarang (*Nested Design*) dua faktor, dimana Faktor II

(konsentrasi pigmen bunga telang) tersarang pada Faktor I (Jenis penstabil). Faktor I terdiri dari 2 level dan Faktor II terdiri dari 4 level sehingga diperoleh 8 kombinasi perlakuan dengan 3 kali pengulangan. Faktor-faktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis penstabil (P) dan konsentrasi pigmen bunga telang (T).

Faktor I meliputi :

P1 : CMC

P2 : Agar-agar

Faktor II meliputi :

T0 : Tanpa Pigmen Bunga Telang (Kontrol)

T1 : Konsentrasi pigmen bunga telang 10% (v/v)

T2 : Konsentrasi pigmen bunga telang 15% (v/v)

T3 : Konsentrasi pigmen bunga telang 20% (v/v)

Tabel 1. Matriks Kombinasi Perlakuan

	T0	T1	T2	T3
P1	P1T0	P1T1	P1T2	P1T3
P2	P2T0	P2T1	P2T2	P2T3

Keterangan :

P1T0 : Penstabil CMC dan Tanpa Pigmen Bunga Telang (Kontrol)

P1T1 : Penstabil CMC dan pigmen bunga telang 10%

P1T2 : Penstabil CMC dan pigmen bunga telang 15%

P1T3 : Penstabil CMC dan pigmen bunga telang 20%

P2T0 : Penstabil Agar-agar dan Tanpa Pigmen Bunga Telang (Kontrol)

P2T1 : Penstabil Agar-agar dan pigmen bunga telang 10%

P2T2 : Penstabil Agar-agar dan pigmen bunga telang 15%

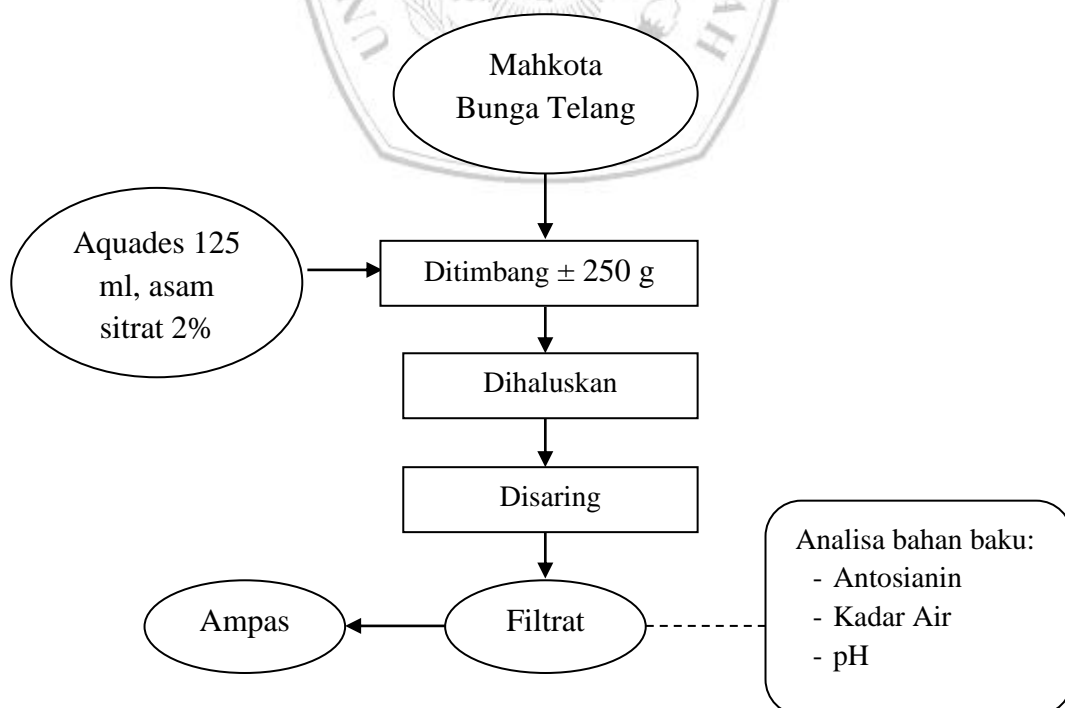
P2T3 : Penstabil Agar-agar dan pigmen bunga telang 20%

### 3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 2 tahap yaitu pembuatan es krim dengan bahan penstabil dan penambahan konsentrasi pigmen bunga telang yang berbeda, kemudian dilanjutkan dengan uji parameter yang telah ditentukan.

#### 3.4.1. Proses Ekstraksi Pigmen Bunga Telang

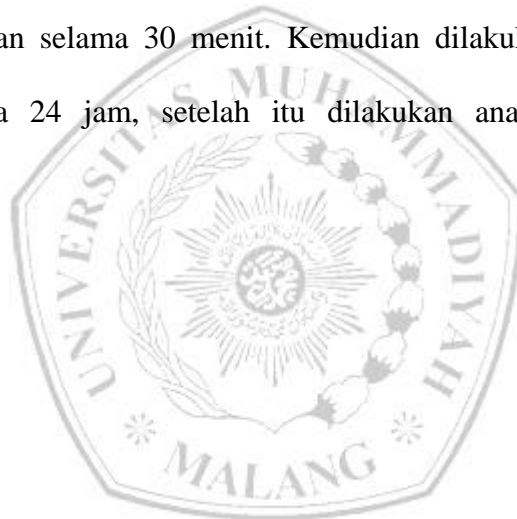
Bunga telang disortir dan dibersihkan kemudian diambil mahkota bunga dan dipisahkan dari tangkainya. Setelah itu ditimbang sebanyak  $\pm 300$  g kemudian dimasukkan ke dalam blender, kemudian ditambahkan dengan aquades perbandingan 1:1 dan asam sitrat sebanyak 2%. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kain saring. Filtrat dimasukkan ke dalam botol gelap dan ditutup rapat menggunakan plastik wrap kemudian disimpan pada suhu rendah selama 2 jam untuk proses maserasi.

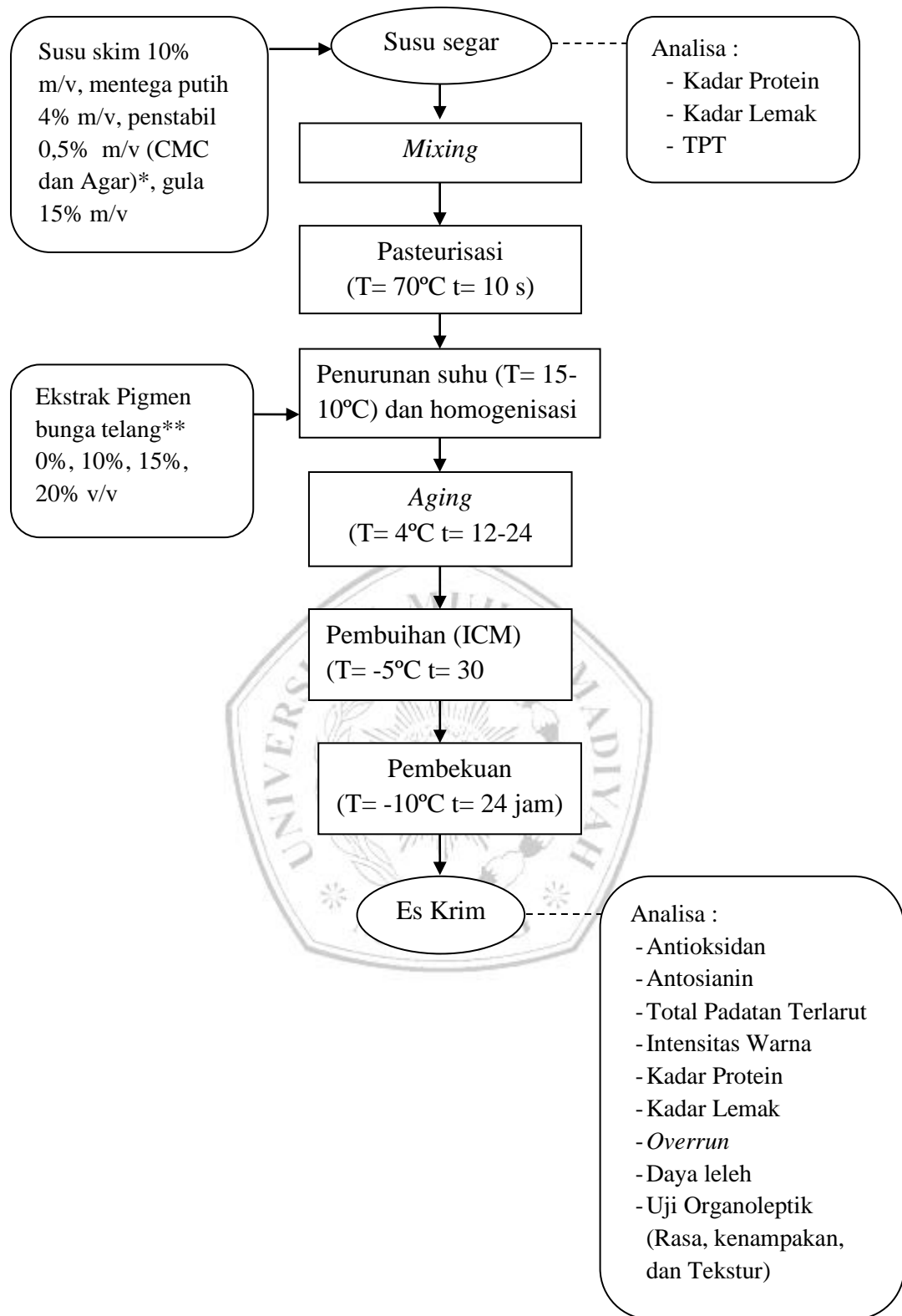


Gambar 1. Diagram Alir Ekstraksi Pigmen Bunga Telang (Saati, 2006)

### 3.4.2. Proses Pembuatan Es Krim

Proses pembuatan es krim telang yaitu dengan cara pencampuran susu segar, bahan penstabil 0,5%, gula 15%, susu skim 10%, dan mentega putih 4%, kemudian dilakukan pasteurisasi pada suhu 70°C dan dipertahankan selama 10 detik sambil dilakukan pengadukan selama pemanasan. Setelah itu dilakukan penurunan suhu hingga mencapai suhu 15-10°C, kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan mixer dengan kecepatan 1 selama 30 menit dan dilakukan penambahan filtrat pigmen bunga telang sebanyak 0%, 10%, 15%, dan 20%. Kemudian dilakukan *aging* pada suhu 4°C selama  $\pm 24$  jam. Setelah itu dilakukan pembuihan selama 30 menit. Kemudian dilakukan pembekuan pada suhu -10°C selama 24 jam, setelah itu dilakukan analisa fisikokimia dan organoleptik.





Gambar 2. Diagram Alir Pembuatan Es Krim (Astawan, 2010)

Keterangan :

\* : Faktor I (Jenis Penstabil)

\*\* : Faktor II (Konsentrasi Ekstrak Pigmen Bunga Telang)

### 3.5. Parameter Pengamatan

Parameter penelitian ini meliputi uji antioksidan, antosianin, overrun, daya leleh, warna, total padatan terlarut, kadar lemak, kadar protein dan organoleptik (rasa, kenampakan, tekstur, dan kesukaan).

#### 3.5.1. Analisa Antioksidan metode RSA (*Radical Scavenging Activity*) (Yue & Xu, 2008)

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam bentuk persentase penghambatan terhadap radikal DPPH (*scavenging activity*) yang dilihat dari absorbansi panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Adapun tahapan analisa antioksidan dengan menggunakan DPPH sebagai berikut.

##### 1. Pembuatan Larutan DPPH

- a. Dihitung kebutuhan serbuk DPPH dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Massa (mg)}}{\text{Mr} \times \text{volume (L)}} \times 100\%$$

- b. Ditambahkan serbuk DPPH ke dalam labu ukur.
- c. Ditambahkan larutan etanol 96% hingga batas tera, dan homogenkan.
- d. Disimpan larutan DPPH pada kondisi gelap dan tertutup rapat pada suhu dingin.

##### 2. Ekstrak Bahan Aktif

- a. Ditimbang sampel sebanyak  $\pm 1$  gram kedalam tube sentrifuse.
- b. Ditambahkan larutan etanol 96% sebanyak 9 mL.
- c. Disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.
- d. Disaring untuk memisahkan supernatant.
- e. Dilakukan uji aktifitas antioksidan.

##### 3. Analisis Aktivitas Antioksidan

- a. Diambil supernatant sebanyak 4 mL dan 4 mL etanol 96% untuk blanko.

- b. Diambil supernatant 1 mL lalu masukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah terbungkus dengan alumunium foil.
- c. Ditambahkan 1 mL larutan DPPH dan menghomogenkan.
- d. Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil.
- e. Disimpan sampel pada kondisi gelap selama 30 menit.
- f. Dibaca absorbansi sampel dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.
- g. Dihitung % inhibisi dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ larutan sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

### 3.5.2. Analisa Antosianin metode *pH Differential* (AOAC, 2005)

#### 1. Pembuatan larutan buffer

##### a. Buffer pH 1

Larutan KCl: 0,025 M KCl (0,186 g dalam 98 mL aquades). Untuk membuat *buffer* pH 1, sebanyak 980 mL larutan KCl 0,025 M ditambahkan dengan 0,63 mL HCl 37%.

##### b. Buffer pH 4,5

Larutan Na-asetat: 0,4 M larutan Na-asetat (5,443 g dalam 96 mL aquades). Untuk membuat *buffer* pH 4,5 sebanyak 960 mL larutan Na-asetat 0,4 M ditambahkan dengan 3 mL HCl 37%.

#### 2. Penentuan antosianin

- a. Sampel dimasukkan dalam pelarut metanol asam dengan perbandingan (1:1) ke dalam *beaker glass*.
- b. Larutan sampel dihomogenkan dan seluruh bagian wadah ditutup dengan penutup gelap.

- c. Sampel dimaserasi pada suhu -23°C sekama 1 jam.
- d. Dimasukkan sebanyak 1 mL sampel ke dalam 2 tabung reaksi. Ditambahkan ke dalam tabung reaksi pertama larutan *buffer* pH 1 sebanyak 9 mL dan tabung reaksi kedua ditambahkan larutan *buffer* pH 4,5 sebanyak 9 mL.
- e. Dilakukan *scanning* dengan panjang gelombang rentang 200-750 nm pada larutan sampel pada kedua *buffer* untuk mengetahui panjang gelombang maksimal yang dimiliki oleh sampel pewarna.
- f. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal dan panjang gelombang 700 nm pada masing-masing contoh dan hasilnya diikalkulasikan berdasarkan persamaan berikut:

$$A = (A_{vis-maks} - A_{700nm})_{pH\ 1} - (A_{vis-maks} - A_{700nm})_{pH\ 4,5}$$

$$\text{Konsentrasi Antosianin (mg/L)} = \frac{[(A \times MW \times DF \times 1000)]}{(\epsilon) \times l}$$

Keterangan :

A = Absorbansi

MW = *Molecular Weight* (Berat Molekul sianidin glukosida = 449,2)

DF = *Dilution factor* (Faktor Pengenceran = 10 mL/1 mL)

$\epsilon$  = *Absorbansi molarl* koefisien ekstingsi molar (29.600 L cm<sup>-1</sup>)

l = lebar kuvet (1 cm)

### 3.5.3. Analisa Total Padatan Terlarut (Wahyudi dan Dewi, 2017)

Metode yang digunakan pada analisa total padatan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan *hand refraktometer*. Prisma refraktometer terlebih dahulu dibilas dengan aquades dan diseka dengan kain yang lembut atau tissue. Sampel ditetaskan ke atas prisma, kemudian arahkan pada sumber cahaya setelah kaca prisma ditutup dan diukur derajat Brix-nya.



#### **3.5.4. Analisa Intensitas Warna dengan *Colour Reader* (Kongruang, 2010)**

Analisa intensitas warna pada penelitian ini menggunakan *colour reader* dimana dengan alat ini, warna yang terdeteksi akan dinotasikan dalam 3 huruf yakni L, a dan b. Nilai L menyatakan derajat kecerahan, nilai a menyatakan gradasi warna dari hijau hingga merah, sedangkan b menyatakan gradasi warna dari biru hingga kuning. Rentang nilai a dan b adalah dari negatif hingga positif.

#### **3.5.5. Analisa Kadar Lemak Metode Hidrolisis Asam (AOAC, 1998)**

##### **1. Persiapan cawan lemak**

Menyiapkan cawan porselen sejumlah sampel yang akan dianalisa, kemudian cawan dioven selama 24 jam. Setelah itu, dinginkan cawan dengan desikator sebelum digunakan analisa lemak. Timbang cawan kosong (b).

##### **2. Persiapan sampel**

- a. Menyiapkan erlenmeyer ukuran 250 mL
- b. Menimbang sampel  $\pm 2$  gram (a), kemudian tambahkan 4 mL etanol 96%
- c. Menambahkan 10 mL HCl yang sudah dilarutkan kedalam aquades (25 mL HCl + 11 mL aquades)
- d. Tutup erlenmeyer dengan aluminium foil, kemudian letakkan pada waterbath dengan suhu 70° C selama 40 menit, kemudian tambahkan 10 mL etanol 96%
- e. Ditambahkan petroleum eter 25 mL kemudian vortex selama 1 mL
- f. Masukkan dalam corong pemisah, kemudian terbentuk 2 lapisan (lapisan atas diambil, lapisan bawah dibuang), titrasi menggunakan corong pemisah lemak dengan ditambahkan petroleum eter sebanyak 15 mL.
- g. Tuangkan hasil titrasi kedalam cawan kosong kemudian oven selama 30 menit

- h. Timbang cawan yang berisi sampel setelah proses pengovenan (c)
- i. Hitung kadar lemak dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{c-b \times 100\%}{a}$$

Keterangan :

a = berat bahan

b = berat awal

c = berat akhir

### 3.5.6. Analisa Kadar Protein Metode Lowry (Sudarmadji dkk, 1989)

Metode lowry mengkombinasikan pereaksi biuret dengan pereaksi lain (Folin-Ciocalteuphenol) yang bereaksi dengan residutyrosine dan tryptophan dalam protein. Reaksi ini menghasilkan warna kebiruan yang bisa dibaca diantara 500-750nm, tergantung sensitivitas yang dibutuhkan. Puncak kecil akan muncul disekitar 500nm yang dapat digunakan untuk menentukan protein dengan konsentrasi tinggi dan sebuah puncak besar disekitar 750nm yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protei dengan konsentrasi rendah. Metode ini lebih sensitif untuk protein konsentrasi rendah dibanding metode biuret (Soeharsono, 2006).

1. Pembuatan reagen Lowry A :

Merupakan larutan asam fosfotungstat : asam fosfomolibdat dengan perbandingan (1:1).

2. Pembuatan reagen Lowry B :

Campurkan 2% natrium karbonat dalam 100 ml natrium hidroksida 0,1 N. Kemudian tambahkan ke dalam larutan tersebut 1 ml tembaga (II) sulfat 1% dan 1 ml kalium natrium tartrat 2%.

3. Penetapan kadar protein :

a. Pembuatan kurva baku

Siapkan larutan bovin serum albumin dengan konsentrasi 300  $\mu\text{g/ml}$  (Li).

Buat seri konsentrasi dalam tabung reaksi 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1. Tambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi 8 ml reagen Lowry B dan biarkan selama 10 menit, kemudian tambahkan 1 ml reagen Lowry A, kocok dan biarkan selama 20 menit. Baca absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm terhadap blanko (sebagai blanko adalah tabung reaksi pertama).

b. Persiapan sampel

Ambil sejumlah tertentu sampel protein yang terlarut misal albumin, endapkan dahulu dengan penambahan amonium sulfat kristal (jumlahnya tergantung dari jenis proteinnya, kalau perlu sampai mendekati kejenuhan amonium sulfat dalam larutan). Pisahkan protein yang mengendap dengan sentrifuse 11.000 rpm selama 10 menit, pisahkan supernatannya. Presipitat yang merupakan proteinnya kemudian dilarutkan kembali dengan dapar asam asetat pH 5 misal sampai 10,0 ml, ambil volume tertentu dan lakukan penetapan selanjutnya seperti pada kurva baku mulai dari penambahan 8 ml reagen Lowry A, kocok dan biarkan selama 20 menit. Baca adsorbansinya pada panjang gelombang 600 nm terhadap blanko.

**3.5.7. Analisa Daya Leleh (Maskuri dkk, 2009)**

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian pengaruh jenis penstabil yang digunakan terhadap daya leleh es krim dengan penambahan pigmen bunga telang dengan berbagai konsentrasi (0%, 10%, 15%, 20%) yang diharapkan akan diperoleh kualitas es krim yang baik dan diketahui bahan penstabil paling optimum. Pengujian daya leleh dilakukan dengan cara es krim ditempatkan dalam

wadah dan dibekukan pada suhu -14°C dalam lemari es selama 24 jam kemudian dikeluarkan pada suhu ruang dan didiamkan hingga es krim mencair dan diperoleh waktu leleh.

### **3.5.8. Analisa *Overrun* (Volume Pengembangan) (Arbuckle, 1986)**

Es krim dimasukkan ke dalam gelas ukur hingga mencapai volume tertentu ( $V_2$ ), kemudian dibiarkan mencair pada suhu ruang hingga berubah menjadi bentuk cair dan diukur volumenya ( $V_1$ ) (Arbuckle, 1986). Persen “*Overrun*” dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Overrun} = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100\%$$

Keterangan:

$V_1$  = Volume adonan (mL)

$V_2$  = Volume es krim (mL)

### **3.5.9. Analisa Organoleptik (Rahayu, 2001)**

Organoleptik merupakan pengujian makanan, berdasarkan kesukaan dan kemampuan untuk mempergunakan suatu produk. Dalam penilaian bahan pangan sifat yang menentukan diterima atau tidak suatu produk adalah sifat indrawinya. Pengujian terhadap tingkat kesukaan dilakukan dengan cara mencicipi es krim. 8 sampel dalam toples yang berbeda dihadapkan pada 30 panelis, kemudian panelis diminta memberikan tanggapan mengenai kesukaannya terhadap es krim yang dicicipi dengan mengisi lembar *quisioner* yang telah disediakan sebelumnya.

Jumlah panelis dalam penelitian ini sebanyak 30 orang dengan kategori panelis tidak terlatih.

Skala rasa yang digunakan dengan skor 1-7 dengan urutan :

Nilai	Rasa	Tekstur	Kenampakan
1	Sangat Asam	Sangat Lembut	Sangat Menarik
2	Asam	Lembut	Menarik
3	Agak Asam	Agak Lembut	Agak Menarik
4	Netral	Netral	Netral
5	Agak Tidak Asam	Agak Tidak Lembut	Agak Tidak Menarik
6	Tidak Asam	Tidak Lembut	Tidak Menarik
7	Sangat Tidak Asam	Sangat Tidak Lembut	Sangat Tidak Menarik

### 3.6. Analisa Data

Data pengamatan terhadap karakteristik fisikokimia dan organoleptik es krim telang dianalisis menggunakan analisa Ragam atau *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan selanjutnya. Apabila perlakuan berpengaruh nyata maka akan dilanjutkan dengan uji DMRT dengan taraf signifikan  $\alpha = 5\%$ .

